

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Юрченко Татьяны Сергеевны на тему “Рациональный дизайн формиатдегидрогеназы из *Staphylococcus aureus*”, представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальностям 1.5.4. Биохимия и 1.5.6. Биотехнология

Изучение формиатдегидрогеназ с уникальной последовательностью имеет практический интерес, так как среди данных ферментов могут быть обнаружены новые перспективные биокатализаторы и охарактеризованы условия их работы. Что касается фундаментального аспекта, следует отметить, в частности, важность исследования взаимосвязи структура-функция методом рационального дизайна и выявление перспективных стратегий направленного мутагенеза.

**Цель** данной диссертационной работы заключалась в изучении взаимосвязи структура-функция рекомбинантной формиатдегидрогеназы (ФДГ) из патогенных бактерий *S. aureus*. Таким образом, **актуальность** представленной работы несомненна.

**Научная новизна** данной работы заключается в том, что диссертантом было исследовано влияние N-концевой аминокислотной последовательности на уровень экспрессии и свойства ФДГ из бактерий *Staphylococcus aureus* (SauФДГ). Впервые была получена форма белка SauФДГ, которая содержит полную аминокислотную последовательность. Кроме того, была предложена комбинированная буферная система, которая приводила к снижению константы Михаэлиса по NAD<sup>+</sup> и увеличению каталитической константы SauФДГ. С помощью рационального дизайна выделено и охарактеризовано 25 новых мутантных форм SauФДГ, которые включали замены в 17 каталитически значимых положениях. Автором диссертации были также установлены изменения в каталитических свойствах после введения выбранных замен. Кроме того, было продемонстрировано снижение константы Михаэлиса по NAD<sup>+</sup> как результат введения меньших по объему

боковых заместителей для 2 мутантных форм. Впервые проведен дизайн C-концевой области SauФДГ и показано ее критическое значение в катализе.

Таким образом, **научная новизна** данной работы совершенно очевидна.

**Теоретическая и практическая значимость** диссертации связана с тем, что автором была показана значимость пост-трансляционной модификации путем отщепления части N-концевой аминокислотной последовательности на примере рекомбинантной SauФДГ. Кроме того, установлено, что только укороченная форма белка проявляет специфическую активность. Следует отметить, что полученные в работе результаты по изучении влияния структура-функция SauФДГ являются важным вкладом в систематическое изучение ФДГ из самых различных источников. С использованием данного фермента автором были подтверждены как ранее используемые приемы рационального дизайна, так и апробированы новые стратегические подходы. Предложенную автором буферную систему можно использовать как при изучении зависимости каталитических свойств ферментов от рН, так и на практике. В частности, эту систему можно предложить поставлять вместе с коммерческими системами ферментативной регенерации никотинамидных кофакторов. Мутантные формы фермента с улучшенными каталитическими свойствами могут быть предложены в качестве компонента ферментативных систем с регенерацией NADH. Изотопно-меченные образцы SauФДГ, полученные автором, можно предложить к использованию для поиска перспективных ингибиторов SauФДГ как потенциальной мишени для борьбы с этим патогеном.

**Общая характеристика диссертационной работы.** Диссертация имеет традиционную структуру и состоит из следующих разделов : Общая характеристика работы, Обзор литературы, Глава Материалы и методы исследования, Глава Результаты и их обсуждение, Заключение, в котором сформулированы выводы, и список литературы. Диссертация изложена на 128 страницах, содержит 27 таблиц и 41 рисунок. Библиография включает 120 источников.

**Обзор литературы** состоит из четырех разделов:

Раздел 1.1 посвящен рассмотрению патогенных бактерий *Staphylococcus aureus*. В этом разделе автор описывает эпидемиологию представителей рода *Staphylococcus* (1.1.1) и борьбу с биопленками (1.1.2). Раздел 1.2 связан с NAD(P)<sup>+</sup>-зависимой формиатдегидрогеназой. В нем можно найти общие сведения о формиатдегидрогеназе (1.2.1); описание физиологической роли и применении формиатдегидрогеназ (1.2.2), а также информацию о филогенетическом анализе аминокислотных последовательностей ФДГ (1.2.3); трехмерной структуре и механизме действия (1.2.4). В разделе 1.3 автором рассмотрены свойства формиатдегидрогеназ из различных источников, в частности каталитические параметры ФДГ (1.3.1); термостабильность (1.3.2); влияние реакционной среды на каталитические свойства ФДГ (1.3.3). Наконец, раздел 1.4 посвящен белковой инженерии формиатдегидрогеназ. В два подраздела, в которых автором рассмотрено, в частности, увеличение термо- и химической стабильности (1.4.1) и изменение каталитических свойств и коферментной специфичности (1.4.2).

Литобзор очень хорошо структурирован, написан грамотно и логично, дает достаточно полное представление о современном состоянии проблемы. Из 120 приведенных автором ссылок 16 источников (прибл. 13 % от общего количества) относятся к периоду 2019 -2024 гг.

**В Материалах и методах исследования** автором аккуратно и достаточно полно описаны все использованные в работе реактивы и реагенты, а также все необходимые методы, в частности поиск последовательностей в базах данных; компьютерное моделирование трехмерных структур; направленный мутагенез; ДНК-электрофорез в агарозном геле; рестрикция фрагментов ДНК; приготовление компетентных клеток *E. coli*; лигирование; трансформация клеток *E. coli* и клонирование; выделение плазмидной ДНК; секвенирование ДНК; экспрессия мутантных форм SauФДГ в клетках *E. coli*; трансформация клеток *E. coli* BL21

(DE3)CodonPlus/pLysS для получения штамма-продуцента; культивирование клеток *E. coli* и создание музейной культуры; выделение и очистка SauФДГ; хроматографическая очистка фермента; диализ; белковый электрофорез в денатурирующих условиях; определение активности ФДГ; определение констант Михаэлиса; определение концентрации белка по методу Бредфорда и определение каталитической константы; определение констант скорости термоинактивации; определение активационных параметров термоинактивации ФДГ; измерение ЯМР спектров.

**Результаты и их обсуждение** представлены в четырех разделах:

- 3.1 Изучение влияния N-концевой последовательности на уровень экспрессии и свойства рекомбинантной SauФДГ;
- 3.2 Исследование влияния состава и концентрации компонентов буферных систем на каталитические свойства SauФДГ;
- 3.3 Белковая инженерия формиатдегидрогеназы из *S. aureus*;
- 3.4 Исследование SauФДГ методом ЯМР.

В целом, эта часть диссертации (**Обсуждение результатов**) отлично структурирована, очень логично написана и проиллюстрирована огромным количеством цветных рисунков (41) и таблиц (27). Все это позволяет получить полное представление о достаточно большом объеме проведенных автором экспериментов и тщательном анализе полученных результатов. Таким образом, безусловной заслугой автора являются безупречная логика, аккуратность и последовательность в планировании и проведении экспериментов, а также тщательное обсуждение полученных результатов.

**В Заключении** диссертации автором также сформулированы выводы.

**Степень достоверности полученных результатов.** Исследование выполнено на высоком научном и методическом уровне с применением самых современных методов исследования. Выводы диссертации сформулированы четко и логически вытекают из результатов проведенного исследования. Научные положения, выносимые на защиту, полностью отражают основные результаты диссертационного исследования.

Основные результаты диссертации представлены в 5 статьях, входящих в список, рекомендуемый ВАК, в частности, две статьи опубликованы в журнале Вестник Московского университета (Серия 2 Химия), одна статья - в журнале Биотехнология и две статьи в журнале Biochimie. Кроме того, результаты работы представлены и обсуждены на всероссийских и международных конференциях.

В целом как диссертационная работа, так и автореферат Юрченко Т.С. написаны грамотно и проиллюстрированы достаточно большим количеством схем, фотографий, цветных рисунков и таблиц.

Из работы следует, что автором выполнен достаточно большой объем исследований с применением самых современных физико-химических методов.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

При прочтении диссертации возникло несколько вопросов и комментариев, в частности, нужно отметить следующие :

1. В п.2.2.20 (стр. 61) при описании определения концентрации белка по методу Бредфорда автор слишком подробно описывает приготовление стандартных растворов.
2. В п.3.2 (стр. 72) автором представлено исследование состава и концентрации буферных растворов при определении каталитических свойств формиатдегидрогеназы из *Staphylococcus aureus*. Была проведена большая работа, однако какой-либо зависимости между составом и свойствами автору обнаружить не удалось. Все буферные растворы содержат фосфат. Возможно, следовало бы изучить каталитические свойства фермента в буферных системах на основе трис или предложить какие-то другие составы без фосфата.
3. Интересна попытка изменить коферментную специфичность (см. п.3.3.2). В литературе, помимо замены остатка аспарагиновой кислоты на остаток

глутамин, встречаются замены на остатки аспарагина, серина и аланина. Не совсем понятно, почему в случае данного фермента автор ограничился только одной заменой.

4. Хотелось бы пожелать автору в дальнейшем не брать в список источников так много старых статей, чтобы увеличить процент новых статей в списке публикаций. Иначе складывается искаженное впечатление как об актуальности работы, так и о том, насколько автор внимательно смотрит новую литературу по теме.

5. В работе встречаются опечатки, неудачные выражения.

Все указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования, а некоторые из них носят характер пожелания.

**Заключение.** Работа Юрченко Т.С. выполнена на высоком научном и техническом уровне. По всем критериям, в том числе актуальности поставленной задачи, а также новизне и значимости полученных результатов диссертация полностью соответствует требованиям “Положения о присуждении ученых степеней” (утверждено Постановлением правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. №748; 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 г. № 1539; 26.09.2022 г. № 1690; 26.01.2023 г. № 101 в действующей редакции от 25.01.2024 г), а автор диссертации Юрченко Т.С., несомненно, заслуживает присуждения учёной степени кандидата химических наук по специальностям 1.5.4. Биохимия и 1.5.6. Биотехнология.

Официальный оппонент:

Главный научный сотрудник,  
Руководитель Лаборатории биомедицинских материалов  
ГНЦ Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Института биоорганической химии  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН  
Специальность, по которой защищена диссертация:  
03.00.04 - Биохимия

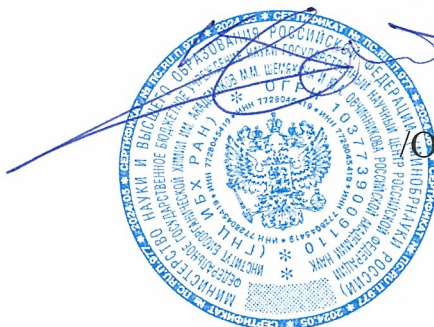
117 997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10  
Тел 8(495) 336 06 00;  
email : [lemark@ibch.ru](mailto:lemark@ibch.ru); lemarkv@hotmail.com

доктор хим. наук

/Марквичева Е.А./

Подпись Марквичевой Е.А. заверяю

Ученый секретарь ГНЦ ФГБУН ИБХ РАН  
доктор физ-мат наук



/Олейников В.А./

16. 10. 2024